



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Maestría en Ciencias Biomédicas



**EFEECTO ANTIOXIDANTE SOBRE NIVELES
PLASMÁTICOS DE GRELINA/LEPTINA Y DAÑO
OXIDATIVO HIPOTALÁMICO EN RATAS CON
DIABETES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Presenta

Q.B.P. Karen Itzel García Pérez

Directora

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Codirectora

Dra. Martha Isela Barragán Bonilla

Chilpancingo de los Bravo, Gro; a Julio del 2021.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 09 días del mes de junio de dos mil veintiuno, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Efecto antioxidante sobre niveles plasmáticos de grelina/leptina y daño oxidativo hipotalámico en ratas con diabetes", presentada por la alumna **Karen Itzel García Pérez**, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dra. Mónica Espinoza Rojo
Dirección de tesis

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dra. Mónica Ramírez Ruano

Dr. Julio Ortiz Ortiz

Dr. Manuel Sánchez Alavez

Vo. Bo

Dr. Daniel Hernández Sotelo
Coordinador de la Maestría en Ciencias Biomédicas

Vo. Bo

Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas



AGRADECIMIENTOS

Es un placer para mí mencionar a las personas que de manera importante, con su ayuda y compañía han colaborado durante la elaboración de ésta tesis.

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Agradezco infinitamente por la confianza depositada en mí, por aceptarme como parte de su grupo de trabajo para realizar éste proyecto de investigación y por el continuo esfuerzo y dedicación para este. Gracias por compartir conmigo su experiencia, sus conocimientos, por todos sus consejos y sus sugerencias, por enseñarme que siempre se pueden hacer mejor las cosas y que siempre se puede lograr lo que uno se propone. Estoy infinitamente agradecida con usted por todo su apoyo durante este tiempo, su compromiso en todo lo que hace y su motivación han sido fundamental en mi desarrollo como profesionista y como persona, me considero una persona muy afortunada por la oportunidad que me brinda. Mi cariño, respeto y admiración para usted siempre Dra.

Dra. Martha Isela Barragán Bonilla

Por su co-dirección en éste trabajo, por la paciencia, dedicación, el tiempo y aportaciones, que han sido sumamente valiosas, en el desarrollo y presentación de ésta investigación, agradezco también por todo su apoyo de principio a fin, cuando acudía a usted en la elaboración práctica de ésta investigación, gracias por ser la persona más comprensiva, sencilla y paciente que me brindó un ambiente agradable y confortable, sin su apoyo todo hubiese resultado diferente, gracias también por el cariño y por compartir conmigo sus conocimientos.

Dra. Mónica Ramírez Ruano

Por el apoyo incondicional en todo momento, por su tiempo, comprensión, ánimos y por darme valiosas aportaciones y sugerencias en todo el desarrollo de ésta investigación.

Dr. Julio Ortiz Ortiz

Por las sugerencias realizadas que me permitieron mejorar la elaboración de éste proyecto, gracias también por sus valiosas aportaciones y por compartir conmigo su conocimiento.

Dra. Berenice Illades Aguiar

Por su participación en la evaluación de éste proyecto, gracias por las sugerencias que nos permitieron integrar el conocimiento adquirido de manera correcta.

Dr. Manuel Sánchez Alavés

Por dedicar parte de su tiempo en la revisión de éste trabajo, gracias también por las sugerencias realizadas que me permitieron mejorar la elaboración de éste, gracias también por sus valiosas aportaciones y por compartir conmigo su conocimiento.

Con cariño, respeto y admiración...

Karen Itzel García Pérez

DEDICATORIAS

Con infinita gratitud dedico este proyecto:

A Dios: Por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida, por guiarme por el camino del bien, por no dejarme desfallecer en los momentos de amargura y frustración, pero sobre todo por ayudarme a seguir adelante aun cuando parecía que el camino era largo y oscuro; por darme salud y la capacidad e inteligencia, para lograr una de mis más grandes metas.

A mis padres Felipe y Minerva: Por ser mi motor y mi más grande motivación. Porque gracias a su apoyo incondicional a lo largo de mi vida he logrado ésta meta, que también es un logro suyo. No tengo manera de agradecerles que sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado parte de su vida por verme triunfar. Jamás existirá una forma de pagarles esa vida de desvelos, sacrificios, esfuerzos, de apoyo, confianza y amor que en mí han depositado. Gracias por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, por acompañarme durante todo mi trayecto de vida, pero sobre todo gracias por su esfuerzo día a día, por su lucha constante en los momentos más difíciles, son sin duda para mí el tesoro más grande y está por demás decir que todo esto es por ustedes. A ti papá, gracias por tu lucha, por el coraje y la valentía con el que has afrontado la vida y por qué a pesar de todo siempre muestras tu mejor cara, no sabes cómo admiro esa fortaleza y esa entereza que se caracteriza. A ti mamá, que puedo decirte, eres la persona más valiente, noble y luchadora que conozco, jamás has dejado de enseñarme y no tienes idea del respeto y admiración que siento por ti, por tu persona, tu humildad, sencillez pero sobre todo por tu valor, tus ganas y tu lucha constante. No tienen idea de lo mucho que los amo, gracias por todo...

A mis hermanas, Anayackzin y Fátima: Por formar parte de mi vida, por su apoyo y ánimo para hacer que la distancia fuera más amena, gracias por compartir conmigo momentos inolvidables que en su mayoría han sido llenos de alegría pero también hemos tenido momentos difíciles. Gracias porque ustedes han sido parte de mi motivación para llegar a alcanzar mis metas, no hubo un solo día en el que no pensara en ustedes y mis padres para poder seguir adelante. Quiero que sepan que siempre deseare para ustedes el éxito y lo mejor en todos los ámbitos de su vida, espero siempre darles un buen ejemplo como hermana, las amo.

A mi Aylene Sahory: Por ser un motor, por todas tus sonrisas que me motivan a seguir siempre adelante, es increíble ver lo pequeñita que eres y lo mucho que provocas en mí, te quiero con el alma mi pequeña zanahoria.

A mis hermosos angelitos Julia Hernández Ayala y Agustina Urquiza Montes: Por ser unas guerreras que jamás se dejaron vencer, gracias por ser un ejemplo de vida para mí y para todos los que las rodeamos, sé que por circunstancias del destino no estuvieron físicamente conmigo, pero sé que desde donde quiera que se encuentren están compartiendo conmigo la dicha de haber alcanzado una metas más, agradezco infinitamente a dios y a la vida por haber tenido unas abuelitas como ustedes, las amo y donde quiera que estén siempre vivirán en mi corazón.

A mis abuelos: Raymundo García y +Jesús Pérez: Por todo el cariño y apoyo que siempre me han brindado, bien dicen que el éxito se alcanza cuando se tiene con quien

compartirlo y ustedes significan para mí más de lo que pudiese expresar. Ambos han contribuido de manera especial en esta meta gracias, los quiero.

A mis Tíos: Diego, Mariana; Estela, Leonardo; Luisa, Florencio; Flor, Fernando; Paty, Pedro; Angélica y Sandra por todo el apoyo y cariño compartido, por su preocupación por mí y mi bienestar a todos y cada uno de ustedes que aportaron su granito para que ésta meta fuera tangible, los quiero.

A mis Primos: Sheyla, Fabián, Wendy, Fernando, Nelly, Dassa, Geovanni, Jessica, Mimi, Dulce, Javier y Carlos, qué se convirtieron en parte fundamental de mi vida, que estuvieron desde el comienzo de mi formación como profesional. Infinitas gracias, por acompañarme en momentos difíciles y estar en los momentos alegres, gracias por ser para mí más que mis primos mis hermanos.

A mis amig@s: Maguie, Cory, Mara, Citla, Cristian y Sara: Quienes sin esperar nada a cambio compartieron conmigo alegrías y excelentes momentos, gracias a los que durante estos años estuvieron a mi lado apoyándome, gracias por ser las personas que más que compañeros se han convertido en amigos que espero conservar siempre, porque las circunstancias nos hicieron amigos pero el tiempo los convirtió en mis hermanos, gracias porque siempre tuvieron una palabra de apoyo, de consuelo y ánimo para mí y aunque nuestra vida ahora parece tomar un camino diferente saben que podrán contar conmigo siempre, son sin duda de las mejores personas que dios y la vida pudo poner en mi camino, los abrazo en la distancia con muchísimo cariño y eterno agradecimiento por hacer el camino más ligero.

Karen Itzel García Pérez

**EFECTO ANTIOXIDANTE SOBRE NIVELES
PLASMÁTICOS DE GRELINA/LEPTINA Y DAÑO
OXIDATIVO HIPOTALÁMICO EN RATAS CON
DIABETES**

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Material y métodos.....	8
<i>Animales.</i>	8
<i>Inducción de DM.</i>	8
<i>Grupos experimentales y programa de tratamiento.</i>	8
<i>Concentraciones de leptina y grelina</i>	9
<i>Expresión del daño oxidativo al ADN.</i>	9
Resultados	11
<i>Efecto del EAE, RVS y CUR sobre la concentración de grelina y leptina plasmática de ratas diabéticas e hiperfágicas.</i>	11
<i>Efecto del EAE, RVS y CUR sobre la expresión del daño oxidativo al DNA en el hipotálamo de ratas diabéticas.</i>	12
Discusión y conclusiones	14
Referencias	19

Resumen

Las hormonas grelina y leptina, son importantes reguladoras de la homeostasis energética a través de señales aferentes desde la periferia al hipotálamo. La hiperfagia diabética es resultado del desequilibrio energético que conduce a la hiperglucemia constante y afecta la generación de las especies reactivas de oxígeno (EROs) y la eficiencia de las defensas antioxidantes, provocando estados de estrés oxidante que favorecen el daño a lípidos, proteínas y DNA, dando lugar a las complicaciones a largo plazo. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del tratamiento con los antioxidantes extracto de ajo envejecido (EAE), resveratrol (RVS) y curcumina (CUR) sobre el daño al DNA en el núcleo arcuato de ratas diabéticas y su relación con el nivel de leptina y grelina en circulación. Los niveles de grelina y leptina fueron evaluados en plasma de ratas tratadas con EAE, RVS y CUR durante 4 semanas. Para evaluar la expresión del daño al DNA (8-oxoguanina) por inmunofluorescencia en el núcleo arcuato (ARC) del hipotálamo se usaron cortes cerebrales. Los animales diabéticos sin tratamiento no mostraron cambios en la concentración de grelina, pero sí una disminución en los niveles de leptina ($p < 0.05$) en plasma. Los tratamientos con EAE y CUR provocaron un incremento del 20 y 18% respectivamente, en los niveles de grelina ($p < 0.05$) y un incremento del 12.4% en los niveles de leptina en plasma cuando se comparan al grupo control diabético. La expresión de la 8-oxoguanina en el ARC fue mayor en el grupo de las ratas diabéticas en comparación al grupo control sano. El grupo tratado con EAE y RVS mostró una tendencia a disminuir la expresión del 8-oxoguanina, pero, fue el grupo tratado con CUR el que indujo disminución del 8-oxoguanina en comparación con el grupo diabético. El tratamiento con antioxidantes parece no tener un efecto importante sobre la concentración de grelina y leptina en circulación; pero, la disminución del daño al ADN después del tratamiento con CUR sugiere que el uso prolongado de este antioxidante puede mejorar el daño oxidativo en la diabetes.

Palabras Clave: Grelina, leptina, hiperfagia diabética, estrés oxidante, DNA, antioxidantes, extracto de ajo envejecido, resveratrol y curcumina.

Abstract

The hormones ghrelin and leptin are important signal regulators of energy homeostasis from the periphery to the hypothalamus. Diabetic hyperphagia is the result of the intracellular energy imbalance that leads to a state of constant hyperglycemia resulting in the generation of reactive oxygen species (ROS) and deficiency of antioxidant defenses, causing oxidative stress states and damage to lipids, proteins and DNA, leading to long-term complications. The objective of this study was to evaluate the effect of treatment with the antioxidants aged garlic extract (EAE), resveratrol (RVS) and curcumin (CUR) on DNA damage in the arcuate nucleus of diabetic rats and its relationship with the level of leptin and ghrelin in circulation. Ghrelin and leptin levels were evaluated using plasma samples from rats treated with EAE, SVR and CUR for 4 weeks. In addition, brain slices were used to evaluate the expression of DNA damage (8-oxoguanine) in neurons of the arcuate nucleus (ARC) by immunofluorescence. Diabetic animals without treatment did not show changes in ghrelin concentration in plasma but showed a decrease in leptin levels ($p < 0.05$). Treatments with EAE and CUR caused a 20% and 18% increase, respectively, in ghrelin levels ($p < 0.05$) and a 12.4% increase in leptin levels in plasma. On the other hand, the expression of 8-oxoguanine in the ARC was higher in the group of diabetic rats compared to the non-diabetic group. The group treated with EAE and RVS showed tendency to decrease the expression of the immunofluorescence signal. Treatment with CUR induces a greater decrease of 8-oxoguanine compared to the diabetic group. Antioxidant treatment does not have a significant effect on the concentration of ghrelin and leptin in plasma; the decreased in DNA damage after CUR treatment suggests that prolonged use of this antioxidant can improve the oxidative damage in diabetes.

Key Words: Ghrelin, leptin, diabetic hyperphagia, oxidative stress, DNA, antioxidants, aged garlic extract, resveratrol and curcumin.

Introducción

La diabetes mellitus (DM) tipo 2 o no insulino dependiente se ha considerado como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la población adulta a nivel mundial (Ogurtsova et al., 2017). Se define como un conjunto de trastornos metabólicos derivados de un estado de hiperglucemia e hiperinsulinemia constante que conduce a alteraciones metabólicas que puede derivar en alteraciones del sistema inmune, sistema circulatorio, aterosclerosis, neuropatía, retinopatía, nefropatía hasta derivar en deterioro sistémico y muerte por complicaciones de cada aparato o sistema. Los síntomas iniciales más comunes se relacionan con fatiga, visión borrosa, polidipsia, poliuria, hiperfagia y pérdida de peso (ADA, 2017). La hiperfagia diabética surge como un mecanismo de compensación a la falta de glucosa intracelular en tejidos insulino dependientes a pesar de que el plasma es hiperglucémico e hiperinsulinémico. Por lo tanto, se deriva en un desequilibrio en la homeostasis energética (Parker y Bloom, 2012) con activación de centros hipotalámicos para inducir la conducta de búsqueda y consumo de alimentos.

El sistema nervioso central (SNC) desempeña un papel fundamental en la regulación de la homeostasis energética a través de señales vagales y hormonales de retroalimentación positiva y negativa, generadas en estómago, páncreas, tejido adiposo e hígado, que son detectadas por las neuronas en el hipotálamo (Ferrini et al, 2009). Dentro del hipotálamo, el núcleo arcuato (ARC) que está localizado en una región estratégica. Su cercanía con la eminencia media, que es uno de los órganos circunventriculares donde la barrera hematoencefálica (BBB, Blood Brain Barrier) está ligeramente modificada con capilares semipermeables, permiten el intercambio selectivo entre moléculas del flujo sanguíneo y cerebroespinal con las neuronas del hipotálamo. En este núcleo se encuentran poblaciones neuronales que activan circuitos hipotalámicos relacionados a inducción de ingesta de alimentos y poblaciones neuronales que activan circuitos hipotalámicos relacionados disminución de ingesta de alimentos o saciedad (Prior y cols, 2011).

El ARC está compuesto por dos grupos de neuronas; las orexígenicas que expresan tanto al neuropéptido Y (NPY) y al péptido relacionado con Agouti (AgRP), que promueven la ingesta de alimento y son importantes reguladores de la homeostasis energética, y las anorexígenicas que sintetizan la hormona estimulante de α -melanocitos (α -MSH) a partir del precursor de proopiomelanocortina (POMC) y CART que inducen saciedad (Ferrini et al, 2009; Kim et al., 2014). Las neuronas NPY/AgRP del ARC que estimulan la ingesta de alimentos 1) proyectan a núcleo paraventricular (PVN) y lo inhiben, 2) proyectan a núcleo dorsal medial (DMH) y ventral medial (VMH) del hipotálamo y modulan su actividad y 3) activan a neuronas que producen orexinas y neuronas que contienen la hormona concentradora de melanina (MCH). Las neuronas POMC/CART en el ARC que disminuyen la ingesta de alimentos 1) proyectan al área lateral hipotalámica y lo inhiben, 2) proyectan a núcleo dorsal medial (DMH) y ventral medial (VMH) del hipotálamo y modulan su actividad y 3) activan a neuronas localizadas en el núcleo paraventricular que producen factor liberador de corticotropina (CRF) y neuronas que producen hormona liberadora de tirotrópina (TRH) (Millington, 2007; Ferrini et al, 2009; Kim et al., 2014).

La expresión de estos neuropéptidos, es inducida principalmente por señales que se producen fuera del SNC, en su mayoría por hormonas peptídicas, como la insulina y leptina con efectos anorexigénicos, y la grelina con actividad orexigénica (Ferrini et al, 2009; Kim et al., 2014; Harriette et al., 2014). La unión de insulina a sus receptores (IR) en las neuronas del ARC, inicia cascadas de señalización que activan a PI3K/Akt, a su vez activando neuronas POMC/CART e inhibiendo la actividad de las neuronas NPY/AgRP (Millington, 2007)

Por otra parte, la leptina es una hormona secretada por el tejido adiposo en proporción a las reservas de grasa, su función principal es transmitir información sobre el estado energético del organismo (Park et al., 2015; Triantafyllou et al., 2016). Actúa principalmente como una señal aferente para el cerebro, y en particular para el hipotálamo, donde coordina la homeostasis energética a través de la modulación de la ingesta de alimentos y el gasto energético. Cuando se une a sus

receptores (LepR), activa la vía JAK-STAT que regula la transcripción de POMC en neuronas POMC/CART (Belgardt y Brüning, 2010).

Grelina es una hormona peptídica de 28 aminoácidos que se produce principalmente en el estómago, también, se produce en el ARC del hipotálamo, en el pulmón y en el riñón y su secreción se activa por estados hipoglucémicos. La grelina se encuentra en forma acilada y no acilada, la acilada es un ligando para el receptor 1 secretagogo de la hormona del crecimiento (GHSR1) y su cascada de señalización estimula la actividad de la fosfolipasa C. Lo anterior genera el incremento en IP₃ y Ca²⁺ intracelular, generando la estimulación de factores de transcripción esenciales para NPY y AgRP, favoreciendo el apetito (Edwards et al., 2017; Pradhan et al., 2014).

La hiperglucemia crónica favorecida por el desequilibrio en la ingesta de alimentos, promueve el incremento en el flujo de glucosa hacia el interior de la célula siempre y cuando haya señal de la insulina, favoreciendo la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la disminución en la capacidad del sistema de defensa antioxidante, condición conocida como “estrés oxidante” (Nakabeppu et al., 2014).

Durante el metabolismo de la glucosa normalmente se forman EROs, principalmente en la mitocondria durante la fosforilación oxidativa en la cadena transportadora de electrones (CTE), que se encuentran en la membrana interna de las mitocondrias. En este proceso, los acarreadores de electrones NADH y FADH₂ (generados en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos-TCA) entran a la CTE y transfieren sus electrones en los diferentes complejos hasta el último aceptor, que es el oxígeno molecular (O₂) reduciéndolo a H₂O, sin embargo, del 1-4% es reducido parcialmente a anión superóxido (O₂⁻), una ERO altamente reactiva, que bajo la acción de la superóxido dismutasa (SOD) es convertido a peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El H₂O₂ puede reducirse parcialmente en un oxidante más fuerte, el radical hidroxilo (OH), por acción de los iones ferrosos libres en la reacción Fenton, a su vez, puede reducirse en agua por acción de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) o catalasa (CAT) (Gutowski y Kowalczyk, 2013).

Por otra parte, el exceso de glucosa intracelular genera aumento en la actividad de otras rutas metabólicas como la vía de los polioles, donde la enzima aldosa reductasa que en normoglucemia, tiene baja afinidad hacia la glucosa convierte glucosa a sorbitol, utilizando como cofactor a NADPH, el cual es requerido para la regeneración del antioxidante glutatión reducido (GSH). Por lo que la activación de la vía de los polioles induce la disminución de las defensas antioxidantes, y la capacidad celular de amortiguar la producción de EROs (Yang et al., 2011).

Cuando hay una sobreproducción de las EROs como en la DM, además de alterar vías de señalización, pueden causar daño macromolecular, contribuyendo a modificaciones en la estructura y función celular de lípidos, proteínas y DNA, en diferentes órganos (Simone et al., 2008; Kharroubi et al., 2015).

En el DNA, el daño se lleva a cabo en las guaninas, que al ser oxidadas por el radical OH, forman la 8-oxoguanina (8-oxoG), esta es una modificación de base que al ser oxidada, es reconocida como timina; esto conlleva la disfunción celular o muerte celular favoreciendo así a la patogénesis de complicaciones macro y microvasculares como la nefropatía diabética entre otras; que se dan por la activación de factores de transcripción en vías sensibles a estrés (Nakabeppu et al., 2014). Existe evidencia científica que demuestra que hay un aumento en los niveles de 8-oxoG en el tejido insulino dependiente de ratas diabéticas y en la orina de pacientes con el tipo 1 y diabetes tipo 2 con complicaciones diabéticas. En un estudio realizado por Simone, et al en el 2008, demostraron que en la corteza renal de ratas diabéticas la hiperglucemia constante y el peróxido de hidrogeno estimula la fosforilación de Akt y tuberina que provoca la acumulación del 8-oxoG y disminuye la expresión de la enzima reparadora del ADN que reconoce y escinde el 8-oxoG, la 8-oxoG-ADN glicosilasa (OGG1). Además, demostraron que el antioxidante N-acetilcisteína inhibió significativamente la generación de ROS, la Akt/proteína quinasa B y la fosforilación de la tuberina que dio como resultado la disminución del 8-oxoG y una regulación positiva de la expresión de la proteína OGG1 (Simone et al., 2008).

Actualmente se ha empleado tratamiento antioxidante para minimizar el efecto del estrés oxidativo, en combinación con el tratamiento farmacológico utilizado para mejorar la captación de glucosa por las células. En nuestro grupo de trabajo se ha evaluado el efecto de antioxidantes como extracto de ajo envejecido (EAE), resveratrol (RSV) y curcumina (CUR) sobre la hiperfagia diabética y se relacionó con los cambios en la expresión de moléculas que regulan el apetito y marcadores de estrés oxidante de lípidos y proteínas en circulación. Los resultados obtenidos mostraron que los animales diabéticos tuvieron hiperglucemia en ayuno, hiperfagia, poca ganancia de peso corporal, resistencia moderada a la insulina, bajos niveles de insulina, estrés oxidativo, aumento en la expresión de NPY y disminución de POMC en ARC. Además, el tratamiento con EAE indujo en los animales de experimentación una actividad antihiperglucemiante; mientras que RSV, CUR y la dieta controlada tuvieron un efecto hipoglucemiante, pero solo, la CUR logró atenuar el estrés oxidante. Por otra parte, ningún tratamiento provocó la disminución en la hiperfagia diabética, sin embargo, el EAE y la CUR promovieron la disminución de la expresión de NPY (Barragán, et al. 2019).

No se ha definido si esta disminución en la expresión de NPY, está relacionada con la regulación de moléculas desde la periferia como leptina y grelina, por lo que el objetivo de nuestro estudio fue evaluar el nivel de estas hormonas en una condición diabética y definir si existe daño oxidativo en el DNA en regiones específicas de otros tejidos con mayor aporte de glucosa como el hipotálamo, en el cerebro, así mismo, determinar si la administración de diferentes antioxidantes, como el EAE, RVS y CUR, tienen efecto sobre las concentraciones de leptina y grelina en circulación y un impacto en la disminución del daño oxidativo en el DNA del hipotálamo.

Material y métodos

Animales.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar que fueron alojadas en el Bioterio de la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro) con acceso a libre demanda de alimento (Dieta comercial estándar de PURINA Rodent Lab Chow 5001, Ralston Purina Co. St. Louis, Mo, USA) y agua, y durante el estudio los animales se mantuvieron bajo humedad constante (50-60%) y temperatura (21-25°C) en condiciones constantes de temperatura (21-25°C) y ciclos de 12 h luz y 12 h de oscuridad. Las ratas fueron cuidadas bajo las especificaciones que indican la NOM-062-ZOO-1999 y las reglas establecidas por la comisión de ética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN). Aprobación del proyecto: Protocolo 32/17 con No. de oficio: CICUAL/SO/VI/22617/028/2017.

Inducción de DM

Los animales de experimentación con dos días de edad y ayuno de 8 h, fueron inoculados vía i.p. con 70 mg/kg de estreptozotocina (STZ) (SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO, USA) disuelta en 25 µl de buffer de citrato de sodio con pH de 4.5. Inmediatamente las ratas fueron regresadas con sus madres y se destetaron a los 21 días de edad. Posteriormente, se les suplementó con agua azucarada al 10 % (Azúcar comercial estándar elaborada con base en las especificaciones de la NOM051 SCFI/SSA1/2010) durante 4 semanas. A la 7ª semana de edad, las ratas se separaron en cajas individuales para su adaptación, y a partir de la 8ª semana se realizaron pruebas para determinar la presencia de DM. Las ratas con glucosa en ayuno superior a 200 mg/dL y que presentaron hiperfagia y polidipsia (con base a los resultados del monitoreo de la ingesta de alimento y consumo de agua), fueron consideradas para este estudio (Barragán-Bonilla et al 2019).

Grupos experimentales y programa de tratamiento

Los animales fueron clasificadas en 5 grupos de estudio de manera aleatoria: 1) Ratas control (C); 2) ratas diabéticas sin tratamiento (DM-ST); 3) ratas diabéticas

tratadas con EAE (DM+EAE); 4) ratas diabéticas tratadas con resveratrol (DM+RVS) y 5) ratas diabéticas tratadas con Curcumina (DM+CUR). Posteriormente, se administraron los tratamientos a los grupos correspondientes por vía oral, diariamente durante cuatro semanas. Las dosis de los antioxidantes utilizadas se realizaron con base en las recomendaciones previamente publicadas: Extracto de ajo envejecido se utilizaron 200 mg/kg (Barragán, 2015), de curcumina 50 mg/kg (Yu et al., 2012); y de resveratrol 2.25 mg/kg (Jing et al., 2013). [RSV y CUR (SIGMA Aldrich, St. Louis MO, USA); EAE (Wakunaga de América Co., Ltd, Mission Viejo, CA, USA)].

Concentraciones de leptina y grelina

Las concentraciones de leptina fueron medidas utilizando el kit de ELISA (Leptina, de Crystal Chem, Elk Grove Village, Illinois, USA); mientras que para la grelina se utilizó el kit de ELISA (Grelina acilada, de Mybiosource, San Diego, CA, USA) siguiendo las indicaciones de los fabricantes. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas después de 4 semanas de tratamiento, al momento del sacrificio de las ratas con previo ayuno de 8 h y mediante punción cardiaca. Las muestras fueron centrifugadas para obtener el plasma y realizar las mediciones correspondientes.

Expresión del daño oxidativo al ADN

a) Recolección del cerebro y preparación de las muestras:

Para la recolección del cerebro, las ratas fueron anestesiadas con 65 mg/kg de PC de pentobarbital sódico vía i.p. (Cheminova de México, CDMX, México) (i.p.), posteriormente fueron perfundidas transcárdicamente con buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4 (Solución A), seguido de perfusión con paraformaldehído (de SIGMA Aldrich, Darmstadt, Alemania) al 4% (Solución B). El cerebro fue extraído y fijado por 16 h en solución B y transferido a un buffer con sacarosa al 15% por 24 h, y posteriormente a un buffer de sacarosa al 30% por 24 h a 4 °C. Posteriormente, el cerebro fue congelado en una solución con polietilenglicol (Tissue-Tek O.C.T. Compound de SAKURA, München, Alemania) para su uso posterior. Se realizaron cortes utilizando el criostato (Leica CM1950, Buffalo Grove, Illinois, Estados

Unidos), posteriormente estos fueron colocados en portaobjetos y cajas tomando en cuenta el grosor de los cortes y fueron almacenados a -20 °C en solución crioprotectora, hasta su uso.

b) Inmunofluorescencia para la detección de 8-oxoguanina en el hipotálamo

Las secciones de tejido fueron lavadas dos veces con buffer PBS 0.1M pH 7.4 a temperatura ambiente durante 5 min, posteriormente se dejaron lavando con la misma solución durante la noche previa al inicio de la inmunofluorescencia para eliminar el exceso de solución crioprotectora en los cortes. Una vez concluido el lavado se prosiguió a realizar dos lavados más con el buffer PBS a temperatura ambiente durante 10 min cada uno. Se realizó una incubación a 37°C con 500 ul de HCL 2N durante 10 min, después de dos lavados de 3 min cada uno con buffer PBS, se neutralizó la reacción con 500 ul de Tris-Base 50 mM pH 8.5 durante 15 min. Los cortes fueron bloqueados con una solución de BSA al 5%, suero de normal de cabra al 5% y Tritón al 0.4% (Solución B) por 2 h a temperatura ambiente. Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-8-oxoguanina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) diluido (en solución B) toda la noche a 4°C. Después, se realizaron cuatro lavados con buffer PBS por 10 min cada uno a temperatura ambiente. Posteriormente, las secciones se incubaron por 2 h en la oscuridad con el anticuerpo secundario Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 568 (Invitrogen CA, USA) (diluido en solución B), y después se realizaron cuatro lavados con buffer PBS por 10 min cada uno a temperatura ambiente. Se realizó una tinción incubando los cortes con DAPI (1:1000) durante 10 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Se realizaron cuatro lavados con agua milli-Q por 10 min cada uno a temperatura ambiente. Las secciones fueron fijadas a un portaobjetos con 15 ul de reactivo DABCO y se observaron bajo un microscopio de fluorescencia y/o confocal.

Análisis de datos. Los datos fueron expresados como media \pm error estándar (EE). La variación entre grupos fue medida por un análisis de varianza (ANOVA) seguida por la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. El análisis estadístico se

realizó usando el Software Graphad Prism v5.0. La significancia estadística se consideró con un valor de $p < 0.05$.

Resultados

Efecto del EAE, RVS y CUR sobre la concentración de grelina y leptina plasmática de ratas diabéticas e hiperfágicas.

Con el fin de determinar si el tratamiento con los antioxidantes tiene efecto sobre la concentración de grelina y leptina en el organismo de animales diabéticos se midió el nivel de estas hormonas en plasma de los diferentes grupos de estudio después de cuatro semanas de tratamiento con los antioxidantes.

En el grupo de animales diabéticos sin tratamiento con respecto al control observamos que las concentraciones de grelina, mostraron un incremento no significativo (Figura 1a), mientras que, las concentraciones de leptina disminuyeron significativamente 56.2% (Figura 1b).

Además, encontramos que el tratamiento con EAE y CUR en los animales diabéticos provocó un incremento en la concentración de grelina del 20 y 18% respectivamente, con respecto al grupo DM-ST, así mismo, se observó un aumento del 14.2% en los niveles de leptina plasmática en los mismos grupos.

Sin embargo, en las concentraciones de grelina solo los animales tratados con EAE y CUR mostraron un incremento significativo con respecto al grupo de control, mientras que, la disminución en la concentración de leptina fue estadísticamente significativa en todos los animales diabéticos con y sin tratamiento con respecto al control. (Figura 1).

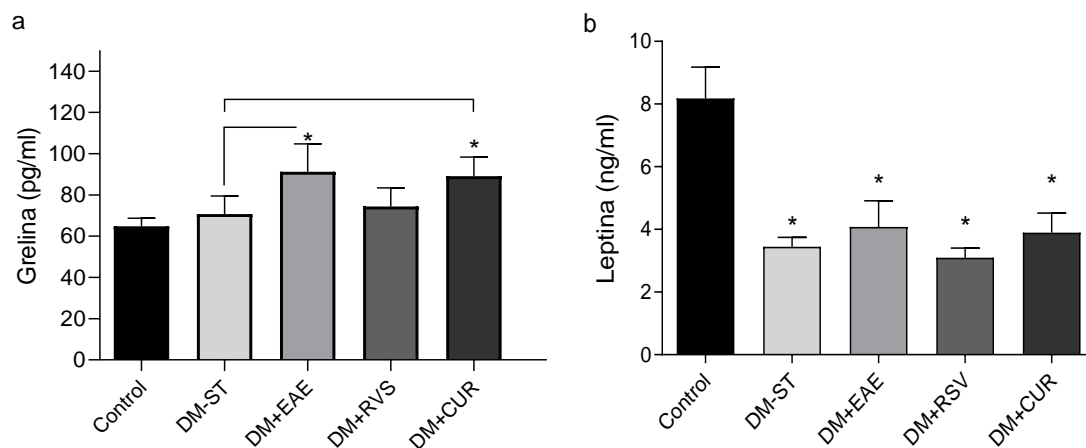


Figura 1. Concentración de grelina y leptina plasmática. La concentración de las hormonas fue determinada en los grupos control y experimentales después de 4 semanas de tratamiento con EAE (DM + EAE), RSV (DM + RSV), curcumina (DM + CUR). El asterisco indica que los datos son significativamente diferentes del grupo control (*= $p < 0.05$ vs DM-ST).

Efecto del EAE, RVS y CUR sobre la expresión del daño oxidativo al DNA en el hipotálamo de ratas diabéticas.

Para determinar el daño oxidativo al DNA en el núcleo ARC del hipotálamo de animales diabéticos y en respuesta a los tratamientos con EAE, RVS y CUR, se midió la expresión del 8-oxoG en esta zona cerebral mediante inmunofluorescencia y análisis densitométrico en secciones de cerebro de ratas de los diferentes grupos de estudio.

Los resultados demuestran un incremento en la expresión del 8-oxoG en los animales DM-ST con respecto al grupo control ($p < 0.05$, vs grupo Control). Los animales diabéticos tratados con CUR mostraron una disminución significativa, (21.9%) de la expresión con respecto al grupo de animales diabéticos sin tratamiento ($p < 0.05$, vs grupo DM-ST). En tanto que el tratamiento con RVS y EAE, inducen una disminución del 12.5% en los niveles de expresión de 8-oxoG en el núcleo ARC del hipotálamo, lo que no tienen significancia estadística (Figura 2).

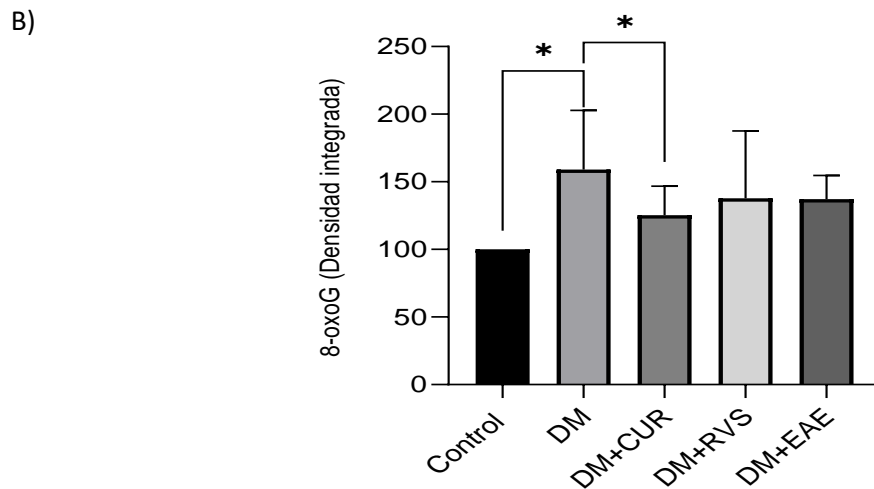
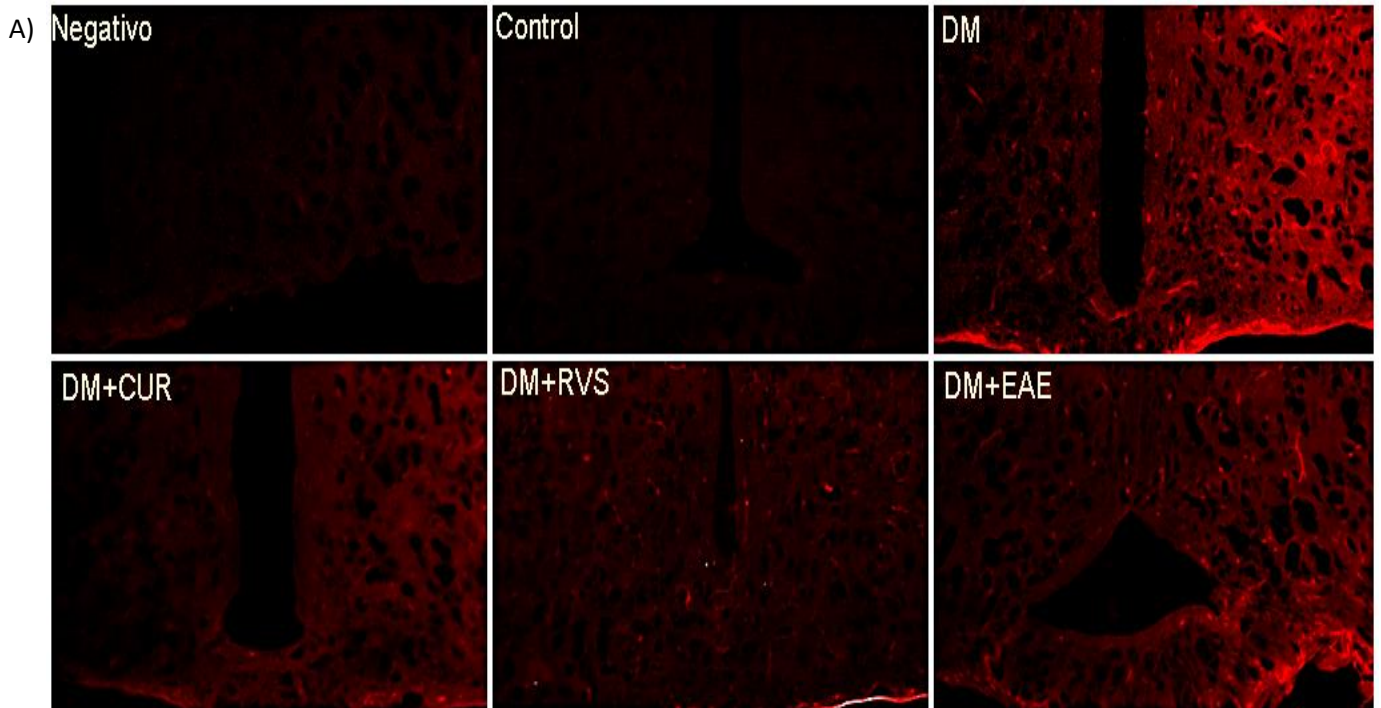


Figura 2. Expresión de 8-oxoG en núcleo arcuato del hipotálamo de animales diabéticos. A) Se muestra la inmunofluorescencia para la detección de 8-oxoG (1:100) en hipotálamo, como anticuerpo secundario se empleó Rodamina anti-mouse (1:400), y se contratiñó con DAPI (1:1000; azul). Las muestras corresponden a secciones de hipotálamo de los distintos grupos de estudio (Control: grupo sano; DM-ST: grupo con diabetes mellitus sin tratamiento; DM+ CUR: grupo de DM con curcumina; DM+EAE: grupo de DM con extracto de ajo envejecido; DM+RSV: grupo de DM con resveratrol). B) Análisis densitométrico de la intensidad de fluorescencia para 8-oxoG en los diferentes grupos de estudio; el análisis de los datos se realizó utilizando el software Graphpad Prism v5.0, los datos son expresados como media \pm error estándar (EE). La diferencia entre los grupos se

midió utilizando un análisis de varianza (ANOVA) seguida de la prueba de Bonferroni. *p <0.05.

Discusión y conclusiones

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que representa un grave problema de salud pública, debido a la alta mortalidad y que durante su desarrollo y evolución disminuye la calidad de vida ya que debido al estrés oxidativo, suelen presentarse diversas comorbilidades afectándose diversos órganos, entre ellos el cerebro (Van Loon *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2018). Por lo que es emergente explorar la etiología de estas complicaciones en el cerebro que es uno de los tejidos más susceptibles a sufrir daño por estrés oxidativo debido al mayor aporte de glucosa que pueden obtener como consecuencia de la hiperfagia durante esta enfermedad. El objetivo de nuestro estudio fue evaluar el efecto del EAE, RSV y CUR sobre la concentración de grelina y leptina plasmática, además analizar la relación con el posible daño oxidativo al DNA en el ARC de ratas diabéticas.

La grelina y leptina son dos hormonas que juegan un papel importante en la regulación del apetito (Poher *et al.*, 2018); en nuestro estudio encontramos que, en el grupo de diabéticos sin tratamiento, la concentración de grelina plasmática no muestra alteraciones importantes con respecto al control y que los niveles de leptina plasmática se encuentran disminuidos significativamente. Bajo condiciones fisiológicas normales, en periodos de ayuno prolongado, se incrementan los niveles de grelina e inducen la ingesta de alimentos, después de consumir alimentos, las concentraciones altas de glucosa y ácidos grasos actúan como agentes anorexigénicos, así como la insulina y la leptina, que son secretadas en proporción a los nutrientes antes mencionados. La unión de estas hormonas a sus receptores en el ARC, inducen el incremento en la expresión de los neuropéptidos POMC y CART, y la disminución de los neuropéptidos NPY y AgRP, produciendo saciedad.

Sin embargo, los animales diabéticos con y sin tratamiento presentan hiperfagia (Barragán *et al.*, 2019); esto puede ser debido a que a pesar de que no existen diferencias significativas en los niveles de concentración de grelina con respecto al control, los niveles de leptina si se encuentran disminuidos en el grupo de animales

diabéticos, por lo tanto, estos animales no experimentan un aumento en la sensación de saciedad y como consecuencia la ingesta de alimentos continua (Ramírez et al., 2015). Por otra parte, las concentraciones bajas de insulina o la resistencia a esta hormona en los diabéticos impiden que la glucosa en sangre ingrese a las células para que pueda ser convertida en energía, provocando un estado hipoglucémico en el interior de la célula, por lo tanto, se envían señales orexígenicas al cerebro por incremento de grelina. Además, el estrés oxidante favorecido por el estado hiperglucémico que genera la ingesta descontrolada de alimentos, juega un papel clave en este proceso alterando la señalización de la leptina (Jairrad et al., 2009).

Nuestros resultados concuerdan con estudios anteriores realizados por nuestro grupo de trabajo, que indica que existe aumento en la expresión de NPY (Barragán et al., 2019), lo que coincide con el incremento en la concentración de grelina encontrado en el presente estudio. Además también se ha definido que en este modelo de diabetes existe disminución de POMC en el núcleo ARC (Barragán et al., 2019), lo que concuerda con la disminución de leptina que encontramos en este trabajo.

Con respecto al efecto de los antioxidantes sobre la concentración de estas hormonas los resultados obtenidos demuestran que en los animales diabéticos tratados con EAE y CUR se incrementan ligeramente los niveles de grelina y leptina en comparación con los animales diabéticos sin tratamiento. El estrés oxidante favorecido por la condición diabética juega un papel clave en este proceso, pues se ha descrito que afecta la señalización normal de la leptina, por lo que el tratamiento con estos antioxidantes parece no ser suficiente para amortiguar las EROs que pudieran estar causando defectos en la vía de señalización de esta hormona y como consecuencia se impide que lleve a cabo su efecto orexígeno (Jairrad et al., 2009; Ramírez et al., 2015). Por lo tanto, el incremento en los niveles de grelina plasmática puede estar explicado por la disminución en los niveles de leptina, pues al no haber un aumento en la saciedad, la concentración de grelina seguirá aumentando.

Otro de nuestros objetivos fue determinar si existe daño oxidativo al DNA en el núcleo ARC; el 8-oxoG es un marcador al DNA por estrés oxidativo (Simone et al., 2008). En nuestro estudio, los resultados evidenciaron un aumento en la señal de 8-oxoG en aquellos animales diabéticos sin tratamiento en comparación con el grupo control. Bajo condiciones fisiológicas normales durante el metabolismo oxidativo en las mitocondrias, se forman EROs, sin embargo, en condiciones de hiperfagia diabética estas se incrementan y superan la función de las enzimas antioxidantes. A pesar de ser menos reactivo que otras EROs, el H₂O₂ tiene un papel importante debido a su capacidad de difundirse fácilmente a través de las membranas biológicas. Esto permite que el H₂O₂ llegue rápidamente a otros compartimentos celulares como el DNA nuclear y mitocondrial; esta circunstancia aumenta las probabilidades de que el H₂O₂ pueda reaccionar con átomos de Fe⁺⁺ celular produciendo radicales hidroxilo. (Van Loon *et al.*, 2010; Hoeijmakers *et al.*, 2009). Este proceso podría explicar el aumento en la señal del 8-oxoG, debido a que en condiciones de hiperglucemia crónica, algunos tejidos como el cerebro reciben un mayor aporte de glucosa y por tanto, mayor susceptibilidad a sufrir daño por la acumulación de las EROs.

En las ratas diabéticas tratadas con EAE se observó una ligera disminución en la expresión de 8-oxoG en comparación con el grupo de animales DM-ST, estos resultados sugieren que la acumulación del daño oxidativo al DNA podría ser menor si se prolongara el tiempo y dosis del tratamiento. Anteriormente se reportó que el EAE o su componente principal (S-alilcisteína) tiene un efecto anti-hiperglucemiante, debido a que parte de su mecanismo es a través de la modificación en la expresión de transportadores de glucosa como GLUT2 en el hígado, GLUT1 y GLUT4 en el músculo, GLUT1, GLUT3 y GLUT4 en el cerebro (Barragán y Rodríguez, 2013; Barragán, 2015; Espinoza- Rojo 2014). En condiciones fisiológicas normales, la unión de insulina a su receptor en las células del músculo y tejido adiposo promueve la fosforilación del receptor de insulina en residuos de tirosina, esto activa la vía de señalización PI3k/Akt y se estimula el anclaje del transportador de glucosa GLUT4 en la membrana para el ingreso de la glucosa al interior de la célula (Lin et al., 2019). Durante la DM, el estrés oxidante

afecta la cascada de señalización de la insulina a causa de la fosforilación en residuos de serina del receptor de la insulina (Chen et al., 2017).

Asimismo, en aquellas ratas diabéticas tratadas con RVS se observó una tendencia no significativa en la disminución en la expresión de 8-oxoG con respecto al grupo de ratas diabéticas sin tratamiento. Existe evidencia científica que comprueba que el RVS tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y ocasionar el aumento en los niveles de enzimas antioxidantes y disminuir marcadores de estrés oxidativo (Sasaki y Kitamura, 2010). El RVS es un activador de la proteína deacetilasa dependiente de NAD+Sirtuina (SIRT1), que se expresa en núcleos hipotalámicos, la sobreactivación de SIRT1 en hipotálamo suprime la actividad de FOXO1, y la inhibición de la transcripción de AgRP, favoreciendo de esta manera la disminución en el consumo de alimentos (Tsutomu et al., 2010). Sin embargo, diversos estudios describen la baja biodisponibilidad del RVS en tejidos posterior a su absorción en hígado e intestino delgado (Gambini, et al 2013), lo podría ser la principal causa de que no existan diferencias importantes en nuestro grupo de estudio.

Por el contrario, la administración de CUR fue el tratamiento antioxidante que mostro un mayor potencial en la disminución del daño al DNA, mostrando diferencias significativas en los niveles de expresión del 8-oxoG, nuestros resultados concuerdan con lo reportado en nuestro grupo de trabajo en un estudio realizado por Barragán, et al en el 2019, en donde se ha demostrado que el tratamiento con este antioxidante aumenta la actividad de las enzimas GPx y GST y explica la disminución en la concentración de malondialdehído (MDA) y proteínas carboniladas en su estudio , consecuentemente, esto podría explicar la disminución del daño al DNA. Además, diversas investigaciones han demostrado que la CUR tiene la capacidad de activar a múltiples objetivos biológicos, entre los que destaca el factor de transcripción Nrf2, que se une a los elementos de respuesta a antioxidantes (ARE, *antioxidant response element*) que se encuentran en los promotores de las enzimas antioxidantes para estimular la expresión (Raghavendhar and Devanand, 2019).

Por otra parte, se ha informado que la CUR es un tratamiento eficaz para la disminución de glucosa en sangre de animales diabéticos provocando un aumento significativo en los niveles de insulina plasmática (Raghavendhar and Devanand, 2019), por lo que el uso de este antioxidante como tratamiento durante la diabetes, podría ser importante para mantener la integridad celular y de las macromoléculas.

En conjunto nuestros resultados evidencian que ninguno de los tratamientos con los antioxidantes logra restablecer las concentraciones de las hormonas grelina y leptina en circulación, sin embargo, el tratamiento con CUR promueve una disminución importante en la expresión del daño al DNA en el ARC del hipotálamo.

Referencias

ADA/American Diabetes Association (2017). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 37(1), S81–S90.

Barragán, B.M.I., Rodríguez, R.H.A. (2013). Efecto del extracto de ajo envejecido sobre el nivel del mRNA de GLUT1 y GLUT4 en un modelo in vivo de diabetes mellitus (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero.

Barragán, B.M.I. (2015). Regulación del nivel del ARNm de enzimas antioxidantes y Neuropéptido Y por extracto de ajo envejecido en hipotálamo de ratas diabéticas (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero.12.

Barragán, B.M.I. (2019). Efecto los antioxidantes sobre la expresión de moléculas que regulan la conducta alimentaria en ratas diabéticas (Tesis de Doctorado). Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero.

Belgardt B.F., y Brüning J.C., (2010). CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121(2), 97–113.

Chen, W., Balland, E., & Cowley, M. A. (2017). Hypothalamic Insulin Resistance in Obesity: Effects on Glucose Homeostasis. *Neuroendocrinology*, 104(4), 364-381.

Edwards Alexander & Abizaid Alfonso. (2017). Clarifying the Ghrelin System's Ability to Regulate Feeding Behaviours Despite Enigmatic Spatial Separation of the GHSR and Its Endogenous Ligand. *Int J Mol Sci*, 18(4), E859.

Espinoza-Rojo, M., Gómez, C., Parra Abarca, J. (2014). Glucose transporter 1 expression is regulated by Aged Garlic Extract during cerebral ischemia. *Journal of food and Nutrition Research*. 2. 899-905.

Ferrini, F., Salio, C., Lossi, L. & Merighi, A. (2009). Ghrelin in central neurons. *Curr. Neuropharmacol*, 7(1), 37-49.

Fernández, G., Cabral, A., Andreoli, M.F., Labarthe, A., M'Kadmi, C., Ramos, J.G., Marie J. (2017). Evidence Supporting a Role for Constitutive Ghrelin Receptor Signaling in Fasting-Induced Hyperphagia in Male Mice. *Endocrinology*, 159(2):1021–1034.

Gambini, J., López-Grueso R., Olaso-González, G., Abdelazida, K., El Alami, M., Ingles, M. et al. (2013). Resveratrol: distribución, propiedades y perspectivas. *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 48 (2):79–88.

Gutowski M., Kowalczyk S. 2013. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Act. Biochimica Pol.* 60:1 1-16.

Harriette CJ, (2014). Behavioral Neuroscience for the Human Services: Foundations in Emotion, Mental Health, Addiction, and Alternative Therapies. Part 2, Cap11. Brain Structure: Larger (visible to the human eye). Oxford University Press, 73-83.

Hoeijmakers, J.H.J. (2009). DNA Damage, Aging, and Cancer. *N Engl J Med.* 361(15), 1475-85.

Jairrad, T., Roger, M., Galinier, A., Guillou, P., Benani, A., Leloup, C. et al. (2009). Hypothalamic reactive oxygen species are required for insulin-induced food intake inhibition: An NADPH oxidase-dependent Mechanism. *Diabetes*, 58, 1544-1549.

Khalaf A. J. y Whitford D. L. (2010). The use of complementary and alternative medicine by patients with diabetes mellitus in Bahrain: a cross-sectional study. *BMC Complementary & Alternative Medicine.* 10:35, 1-5

Kim J.D., Leyva S., & Diano S. (2014). Hormonal regulation of the hypothalamic melanocortin system. *Frontiers in Physiology*, 480(5), 1-7.

Kook S., Kim G. H., y Choi K. (2009). The Antidiabetic Effect of Onion and Garlic in Experimental Diabetic Rats: Meta-Analysis. *J Med Food.* 12 (3) 552-560.

Kharroubi, A.T. & Hisham, M. D. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes*, 6(6), 850–867.

Lin, Y., Liang, Z., He, L., Yang, M., Liu, D., Gu, H. F., Yang, G. (2019). Gut ghrelin regulates hepatic glucose production and insulin signaling via a gut-brain-liver pathway. *Cell Communication and Signaling*, 17(1), 1-14.

Millington, G. (2007). The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding Behavior. *Nutrition & Metabolism*, 4:18.

Nakabeppu, Yusaku. (2014). Cellular Levels of 8-Oxoguanine in either DNA or the Nucleotide Pool Play Pivotal Roles in Carcinogenesis and Survival of Cancer Cells. *Int J Mol Sci.* 15(7), 12543–12557.

Ogurtsova, K., Fernandez, JD da Rocha, Huang, Y., Linnenkamp, U., Guariguata, L., Cho, Cavan, D., et al. (2017). Atlas de diabetes de la FID: estimaciones mundiales de la prevalencia de diabetes para 2015 y 2040. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 128, 40-50.

Osawa T., Kato Y. (2005). Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. *Ann. N Y Acad Sci.* 1043, 440-51.

Parker J. A. & Bloom S. R., (2012). Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology.* 63(2), 18-30.

Poher, A.L., Tschöp, M.H. y Müller, T. D. (2018). Ghrelin regulation of glucose metabolism. *Peptides*. 100, 236–242.

Pradhan, G., Samson, S.L. y Sun, Y. (2014). Ghrelin: much more than a hunger hormone. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 16(6), 619–624.

Raghavendhar, R.K. and Devanand, L.L. (2019). Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules*. 24 (2), 2930-2957.

Ramírez S., Claret M. (2015). Hypothalamic ER stress: A bridge between leptin resistance and obesity. *FEBS Lett*. 589(14), 1678-87.

Sasaki, T., Kitamura, T. (2010). Roles of FoxO1 and Sirt1 in the central regulation of food intake. *Endocr J*, 57(11), 939–946.

Simone, S., Gorin, Y., Velagapudi, C., Abboud, H. E. and Habib, L. (2008). Mechanism of Oxidative DNA Damage in Diabetes Tuberin Inactivation and Downregulation of DNA Repair Enzyme 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine-DNA Glycosylase. *Diabetes*. 57(10), 2626–2636.

Tsutomu, S., Hye-Jin, K., Masaki, K., Yukari-Ido, K., Hiromi, H., Tetsuya S. (2010). Induction of Hypothalamic Sirt1 Leads to Cessation of Feeding via Agouti-Related Peptide. *Endocrinology*, 151, 6, 2556–2566.

Van Loon, B., Markkanen, E. and Hübscher, U. (2010). Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair*, 9, 604–616.

Verspohl E.J. (2012). Novel pharmacological approaches to the treatment of type 2 diabetes. *Pharmacol. Rev.* 64,188–237.

Yang, H., Jin, X., Kei Lam, C.W., Yan, S.-K. (2011). Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM FESCC*. 49, 1773–1782.

Zou, Y.L., Luo, B., Xie, L., Mao, X.B., Wu, Z.P. and Chao, Y. (2018). Targeting human 8-oxoguanine DNA glycosylase to mitochondria protects cells from high glucose-induced apoptosis. *Endocrine*. 60(3), 445-457.